

TRAKYA YÖRESİNDEKİ SIĞIRLARDA *Leptospira interrogans*
ANTİKORLARININ ELISA VE MİKROSKOBİK AGLUTİNASYON TESTİ
(MAT) İLE BELİRLENMESİ VE KESİME GÖNDERİLEN SIĞIRLARDA
LEPTOSPIROZİS ÜZERİNE BAKTERİYOLOJİK ÇALIŞMALAR*

Serkan İKİZ**

N. Yakut ÖZGÜR**

Detection of *Leptospira interrogans* antibodies by ELISA and Microscopic
Agglutination Test (MAT) in cattle in Trakya district, and bacteriological studies
on leptospirosis in slaughtered cattle.

Summary: Leptospire could not be demonstrated by dark-field microscopy or cultured with EMJH medium in the kidney tissue samples of 96 slaughtered cattle in Trakya district. In the matches blood sera and the blood sera of 96 cattle raised in different farms located in four provinces (Istanbul, Edirne, Kırklareli and Tekirdag) of the district, seven (3.65%) were determined to be positive by MAT. Antibodies to serovar *hardjo* and *grippityphosa* were detected in six (85.7%) and in one (14.3%) of seven sera, respectively. In ELISA, 12 (6.25%) of 192 sera were found to have antibodies. Antibody prevalences in these 12 sera to serovar *hardjo* and *grippityphosa* were determined as 10 (83.3%) and two (16.7%), respectively. Antibodies to the other serovars used in the study were not found in the both tests. The sensitivity and specificity of ELISA were calculated to be 85.7 % and 96.8 %, respectively when MAT was considered as a reference test. The seroprevalence of the infection was higher in females than in males by the both tests while in ELISA the difference by sex was found statistically significant ($p<0.05$). The highest prevalence was found in the city of Edirne. Statistically significant differences ($p<0.05$), between Edirne and Tekirdag, Istanbul were found by the both tests.

Key words: Leptospirosis, cattle, bacteriology, ELISA, MAT.

Özet: Trakya yöresinde mezbahalara kesime sevk edilen 96 sığırın böbrek örneklerinden karanlık saha mikroskobu ile yapılan bakteriyoskopi sonucunda, leptospiralar görülmedi ve örneklerden EMJH besiyerine yapılan ekimler sonucunda da leptospira izole edilmedi. Ayrıca, böbrek örnekleri incelenen 96 ve yöredeki dört ile (Istanbul, Edirne, Kırklareli, Tekirdag) ait çiftliklerde yetiştirilen 96 sığır olmak üzere toplam

* Birinci yazarın doktora tezinden özetlenmiş olup, İ.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-576/240698

** İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34320 Avcılar, İstanbul.

192 sığırın kan serumları MAT ve ELISA ile incelendi. MAT ile yedi (%3.65) serum pozitif bulundu. Bunların altı (%85.7)'sında serovar *hardjo*'ya bir (%14.3)'ünde serovar *grippotyphosa*'ya karşı antikor saptandı. ELISA ile 12 (%6.25) serum örneği pozitif bulundu ve 10 (%83.3)'ünde serovar *hardjo*'ya, iki (%16.7)'sinde serovar *grippotyphosa*'ya karşı antikor saptandı. Her iki test ile de incelenen diğer serovarlara karşı antikor saptanmadı. MAT standart test olarak alındığında, ELISA'nın özgünlüğü %96.8 ve duyarlılığı %85.7 olarak belirlendi. Her iki testin sonucuna göre infeksiyonun prevalansı dışı hayvanlarda erkekler oranla daha yüksek saptandı. ELISA bulgularına göre aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Bulgar iller bazında incelendiğinde, en yüksek pozitiflik oranı Edirne'de belirlendi. Edirne ile Tekirdağ ve İstanbul illeri arasındaki her iki test ile saptanan pozitiflik oranlarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

Anahtar kelimeler: Leptospirozis, sığır, bakteriyoloji, ELISA, MAT.

Giriş

Leptospirozis insan ve değişik hayvan türlerinde, çeşitli patojen leptospira serovarı tarafından oluşturulan infeksiyöz ve dünyada yaygın olarak görülen önemli bir zoonoz hastalıktır. Sığır leptospirozisinin istahsızlık, yüksek ateş, sarılık, hemoglobülinüri, mastitis, organ ve dokularda peteşial hemorajiler, hemolitik anemi, infertilite, abortus, ölü doğum ve septisemi ile karakterize klinik tablosu, infeksiyonu oluşturan serovara göre değişiklikler gösterebilir. Farklı ülke ve hayvan ırklarında değişik serovarlardan infeksiyon oluşturdıkları bildirilmiştir (1, 9, 18).

Sığırlarda leptospira infeksiyonlarına pek çok farklı serovarin yol açtığı saptanmasına karşın, sığırların serovar *hardjo*'nun asıl konakçısı olduğu bildirilmiştir. (14, 16, 17). Hasta hayvanlar başta idrarları olmak üzere süt, atık fetus, yavru zarları, uterus akıntıları ve spermaları ile etkeni saçarak, sağlıklı hayvanlara çeşitli yollarla infeksiyonu bulaştırırlar (12). Hastalığın epidemiyolojisinde gizli taşıyıcıların rolü oldukça fazla olup, etkenin özellikle böbreklere yerleştiği ve semptom göstermeyen hayvanların etkeni idrarla saçtığı belirlenmiştir (12).

Leptospirozisin tanısında, etken izolasyonu önemini korumaktadır. Leptospiraların böbreklerin tubuluslarına yerleşmeleri ve idrarla saçılmaları nedeniyle, çiftlik hayvanlarında etken izolasyonu üzerine çalışmalar genellikle canlı hayvanlardan alınan idrar ya da mezbahalarda kesilen hayvanların böbrek örneklerinden yapılmaktadır (15, 21, 22, 27). Ancak izolasyonun güç ve uzun zaman olması, gönderilen inceleme örneklerinin çok kısa sürede laboratuvara ulaştırılması zorunluluğu gibi nedenlerden dolayı hastalığın tanısında genellikle serolojik testlerden yararlanılmaktadır (21, 22, 26). Sığır leptospirozisinin serolojik tanısında kullanılan en yaygın yöntem MAT'dır. Bununla birlikte, son yıllarda ELISA ile sığır leptospirozisinin tanısı üzerine çalışmalar da yapılmaktadır (23, 24, 27, 28).

Bu çalışmada, Trakya yöresindeki mezbahalara kesime sevk edilen 96 sığırın böbrek örneklerinde bakteriyoskopi ve izolasyon çalışmaları ile leptospiraların varlığı araştırıldı. Ayrıca bu sığırların kan serumları ile aynı yöredeki çiftliklerde yetiştirilen 96 sığırdan elde edilen kan serumlarında sığırlarda yaygın olduğu bildirilen *Leptospira interrogans*'ın *hardjo*, *pomona*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae* serovarlarına karşı

Mikroskobik Aglutinasyon Testi (MAT) ve ELISA ile spesifik antikorların saptanması ve iki farklı serolojik yöntemin karşılaştırılması yapılarak, yöredeki baskın serovarlar ve infeksiyonun prevalansının saptanması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Kan Serum Örnekleri

İnfeksiyonun Trakya yöresindeki tahmini prevalansı %50 kabul edilerek, %95 güven düzeyi ve %10 absolut kesinliğe göre yöredeki değişik ilçe ve köylerde bulunan 96 sığır ve aynı yöredeki 4 farklı mezbahaya, farklı coğrafi özellik gösteren çiftliklerden kesim için sevk edilen, 96 sığır olmak üzere toplam 192 sığırdan tesadüfi örnekleme ile toplandı (6). Steril vakumlu tüplere alınan kan serumu örnekleri soğuk zincir altında Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi; santrifüje edilerek serumları ayrıldı ve kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

Böbrek Örnekleri

İzolasyon için, mezbahalara kesime sevk edilen ve kan örnekleri alınan 96 sığırın aynı zamanda böbrek örnekleri de alındı. Böbrekler asepti - antisepti kurallarına uyularak kapsülü ile birlikte çıkarıldı ve gamma steril örnek poşetlerine konularak soğuk zincir altında, 2-4 saat içinde laboratuvara getirildi.

Bakteriyoskopi

Böbrek örnekleri ortalama 1 cm³ hacminde, korteks ve medullayı içeren bloklara ayrıldı. Üzerine dokuz kısım *Leptospira* Diluent (%1 Bovine Serum Albumin/Sigma A-9418 içeren Phosphate Buffer Saline, pH 7.4) eklenerek bir dakika süreyle homojenize (Coleworth Stomacher 400 Lab. Blender ile) edildi. Homojenizatın üst sıvısından steril pipetle bir damla alınarak temiz bir lam üzerine konuldu ve üzerine lamel kapatılarak 40 x objektif ile karanlık saha mikroskopunda (Olympus CH2-PCD-PL) leptospiraların varlığı yönünden incelendi.

Kültür

Böbrek örneklerinden *Leptospira* Diluent ile hazırlanan homojenatın aynı diluent ile 10⁻¹'den 10⁻⁶'e kadar 10 katlı seri sulandırmaları yapıldı. Her sulandırmadan 5 ml *Leptospira* Enrichment (Difco 0795-72) ile zenginleştirilmiş EMJH (Difco 0794-17) besiyerine 100 µl miktarda ekim yapıldı. Besiyerleri 30°C'de 14 hafta süreyle aerobik olarak inkube edildi. İki haftada bir karanlık saha mikroskobu ile kontaminasyon ve özgün üreme yönünden kontrol edildi. Bu amaçla kültürlerden bir öze dolusu kültür alınarak temiz bir lam üzerine kondu ve üstü lamel kapatılarak 40x objektif ile incelendi (8).

Ayrıca direkt izolasyon amacıyla tüm böbreklerden dilüsyon yapmadan steril cam pasteur pipeti ile örnek alındı ve aynı miktarda EMJH besiyerine ekimleri yapıldı.

Besi yerleri 30°C'de 14 hafta süreyle aerobik olarak inkube edilerek, iki haftada bir karanlık saha mikroskobu ile kontaminasyon ve üreme yönünden kontrol edildi (7).

İzolasyon çalışmalarında kullanılan besiyerlerine, temel besiyerinin hazırlık aşamasında kontaminasyonları önlemek amacıyla 100 µg/ml 5-fluorouracil (Sigma F 6627) eklendi.

Serolojik Testler

Standart Suşlar ve Kontrol serumları

MAT ve ELISA antijenlerinin hazırlanması amacıyla serovar *hardjo* Prajıtino, serovar *grippotyphosa* Moskva V, serovar *icterohaemorrhagiae* RGA ve serovar *pomona* Pomona olmak üzere dört *L. interrogans* suşu kullanıldı. Referans suşlar, *L. hardjo*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, ve *L. pomona* ya karşı hazırlanmış antiserumlar ve negatif kontrol serumları Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Leptospira Laboratuvarı ve F.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlandı.

MAT

Cole ve ark. (4)'nin yöntemine göre yapıldı. Serum örneklerinin steril PBS ile 1/100'den başlayarak çift katlı seri dilüsyonları yapıldı. Her bir dilüsyona eşit miktarlarda canlı antijenler eklendi ve 30°C'de üç saat inkube edildi. %50 aglutinasyon ve lizis görülen son dilüsyon incelenen serumun titresini olarak saptandı. 1/100 ve üzerindeki titrelelere sahip serumların antikor içerdiği kabul edildi (4, 5).

ELISA

Antijen Hazırlama

Standart *L. interrogans* suşlarından EMJH besiyerlerine ekimler yapılarak 30°C'de 10-12 gün çalkalayıcı etüvde üretildi. Üremenin yoğunluğu, tweenin (tween-80) kullanımı ve kontaminasyonların varlığı kontrol edildi. Tweenin tamamen kullanıldığı kültürlerle son konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde formalin (Riedel-de Haen 15512) eklendi ve bir saat oda sıcaklığında (20°C) tutularak inaktive edildi. İnaktive edilmiş leptospira kültürleri 100°C'lik su banyosu içinde her beş dakikada bir çalkalanarak 30 dakika süreyle ısıtıldı. Kültürün sıcaklığı oda sıcaklığına getirildikten sonra 10.000 rpm'de +4°C'de, 30 dakika süreyle steril koşullarda santrifüje edildi ve üst sıvı antijen olarak kullanılmaya kadar +4°C'de saklandı (26).

b. Test

Terpstra ve ark. (26) tarafından bildirilen ELISA yöntemi uygulandı. Antijen düz tabanlı ELISA mikropalakalarının (Greiner) her çukuruna 100 µl ilave edildi ve plakalar direkt güneş ışınlarından kaçınarak, içlerindeki sıvı tamamen buharlaşmaya kadar 3-4 gün oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerleri kapatılarak alüminyum folyo ile sarıldı ve kullanılmaya kadar oda sıcaklığında saklandı. Kullanılmadan hemen önce, antijen kaplanmış mikropalakalar PBS/Tween-20 [%0.05 tween-20 (Sigma P 1379)

içeren PBS (pH 7.2)] solüsyonu ile dört kez yıkandı. Her yıkamanın son iki aşamasında, yıkama solüsyonu çukurlarda bir dakika bekletildi. Bir çukur "Blank" için boş bırakıldı, diğerlerine PBS/Tween/BSA [%0.5 BSA (Sigma A 9418) içeren PBS/Tween-20) solüsyonu ile 1/10 oranında dilue edilmiş test ve kontrol serumlarından 100 µl konuldu. Mikroplakalar üstü kapatılarak 30°C'de bir saat inkübe edildi. İlk yıkamada olduğu gibi dört kez yıkandı. Rabbit Anti-Bovine Ig G Peroxidase Konjugat (Sigma A 5295), PBS/Tween/BSA solüsyonu ile *L. interrogans* serovar *hardjo*, *icterohaemorrhagiae* ve *pomona* antijenleri ile yapılan ELISA için 1/5000; serovar *grippotyphosa* antijeni ile yapılan ELISA için 1/3000 oranında dilue edilerek her çukura 100 µl ilave edildi ve 30°C'de bir saat inkübe edildi ve 4 kez yıkandı. Sonra, 80 mg 5-amino-2 salicylic asid (5AS/ Sigma A 3537) 100 ml distile su içinde 75°C'de çözündürüldü. Kullanmadan önce 1N NaOH ile pH 6.0'a ayarlandı. Kullanmadan hemen önce dokuz kısım 5-AS'e bir kısım %0.05 H₂O₂ eklenerek karıştırıldı ve bütün çukurlara 100 µl eklendi. İki saat oda sıcaklığında inkubasyondan sonra, mikroplakalar optik okuyucu (Organon Teknika Microwell System) ile 492 nm dalga boyunda değerlendirildi. Pozitif kontrol serumunun OD değerinin yarısına eşit ya da yüksek OD değerine sahip test serumları pozitif olarak kabul edildi. Test serumlarının ve konjugatın dilüsyon oranları; pozitif ve negatif olduğu bilinen serumlar ile konjugatın değişik dilüsyonlarının kullanıldığı "Checkerboard titrasyon yöntemi" ile belirlendi.

İstatistik Analiz

Bulguların istatistikî önemlerinin belirlenmesi amacıyla "Chi-Kare (X²) Testi" ve "İki Oran Arasındaki Farkın Önem Kontrolü Metodu" kullanıldı (11). MAT standart test kabul edilerek ELISA'nın spesifitesi ve sensitivitesi belirlendi (6).

Bulgular

Bakteriyoskopi

Doksanalıtı sığıra ait böbrek örneklerinden, karanlık saha mikroskobu ile yapılan bakteriyoskopi sonucunda leptospiralar görülmedi.

Kültür

Böbrek örneklerinin hiç birinden leptospira izole edilmedi.

Serolojik Bulgular

MAT Bulguları

Kesime sevk edilen 96 sığır serumundan yalnızca bir (%1.04) adedinde *L. interrogans* serovar *grippotyphosa*'ya karşı antikor saptandı.

Çiftliklerde yetiştirilen 96 sığıra ait kan serumunun altı (%6.25)'sında serovar *hardjo*'ya karşı spesifik antikorlar saptandı. Serumlar incelenen diğer serovarlara yönelik antikorlar yönünden negatif bulundu.

MAT ile incelenen 192 serum örneğinin yedi (%3.65)'sinde antikor saptandı. Antikor saptanan serumlar arasında serovar *hardjo*'ya karşı antikor taşıyıcılık oranı %85.7, serovar *grippotyphosa*'ya karşı ise %14.3 olarak bulundu. Birden fazla serovar ile ortak reaksiyon veren seruma rastlanmadı. MAT ile antikor saptanan yedi adet serumun ait olduğu sığırın ırk, cinsiyet, yaş ve MAT titrelere ile kaynakları Tablo 1'de gösterilmiştir.

ELISA Bulguları

Kesime sevk edilen 96 sığırın kan serumuyla yapılan ELISA sonucunda, iki adet (%2.03) kan serumunda *L. interrogans* serovar *grippotyphosa*'ya karşı spesifik antikorlar saptandı. Diğer serovarlara karşı antikor saptanmadı.

Çiftliklerde yetiştirilen 96 sığıra ait kan serumu örneklerinin 10 (%10.42)'unda serovar *hardjo*'ya karşı spesifik antikorlar saptandı. Diğer üç serovara karşı antikor saptanmadı.

ELISA ile incelenen toplam 192 serum örneğinin 12 (%6.25)'si pozitif bulundu. Oniki serumun 10 (%83.3)'ünde serovar *hardjo*'ya, iki (%16.7) adedinde serovar *grippotyphosa*'ya karşı pozitiflik saptandı. ELISA sonuçlarına göre de birden fazla serovar ile ortak reaksiyon veren serum örneğine rastlanmadı. ELISA ile antikor içerdiği saptanan 12 adet serumun ait olduğu sığırın ırk, cinsiyet, yaş ve kaynakları Tablo 2'de açıklanmıştır.

Her iki teste göre altı kan serumunun hem MAT hem de ELISA ile antikor içerdiği belirlendi. Altı kan serumu örneği yalnız ELISA ile, bir adet kan serumu örneği ise yalnız MAT ile pozitif olarak saptandı. MAT standart test olarak kabul edildiğinde, ELISA'nın özgünlüğü %96.8 ve duyarlılığı %85.7 olarak belirlendi. ELISA bulgularına göre dişiler ile erkekler arasındaki pozitiflik oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Her iki serolojik testin bulgularına göre, Edirne ile Tekirdağ ve İstanbul illerinde saptanan pozitiflik oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Türkiye'de sığır leptospirozisinin tanısı ve baskın serovarlara saptanması amacıyla bir çok çalışma yapılmıştır. Şahin ve ark. (25), Kars ve Ardahan yöresinde, toplam 990 sığır kan serumunun 333 (%33.63)'ünde MAT ile, 359 (%36.26)'unda ELISA ile *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa* serovarlara karşı antikor saptamışlardır. Araştırmada, 18 şüpheli idrar örneğinden yalnız üç leptospira suşu izole edildiği ancak kontaminasyonlar nedeniyle tiplendirilemediği bildirilmiştir.

Ertaş ve ark. (10), Doğu Anadolu Bölgesi'nin değişik illerindeki mezbahalardan topladıkları 275 sığır kan serumunu *L. hardjo*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. hebdomadis* ve *L. icterohaemorrhagiae* serovarlara karşı spesifik antikorların varlığı yönünden MAT ve ELISA ile

incelemişler, MAT ile 44 (%16), ELISA ile 64 (%23.3) serumda antikor saptadıklarını, MAT referans test olarak kabul edildiğinde, ELISA'nın duyarlılığın %68 ve özgünlüğünün %84 olarak bulunduğunu bildirmişlerdir.

Özdemir (19) Türkiye genelinde sığırlarda leptospirozisin prevalansını belirlemek için yaptığı çalışmada, MAT ile 15 596 sığır serumunu incelemiş ve bunlardan 1254 (%8.04)'ünü pozitif bulmuştur. Çalışmada serumlar yedi serovar yönünden (serovar *hardjo*, *pomona*, *canicola*, *hebdomadis*, *australis*, *grippityphosa*, *icterohaemorrhagiae*) incelenmiş, 1034 (%82.46)'ü *L. hardjo* ve 220 (%17.54)'si *L. grippityphosa* antikorları yönünden pozitif bulunmuştur. Alınan sonuçlara göre infeksiyonun Trakya yöresindeki (Edirne, Kırklareli, Tekirdağ) prevalansı %3.39 olarak belirlenmiştir.

Bulu ve ark. (3) 13 serovara ait antijenleri kullanarak MAT ile yaptıkları serolojik çalışmada, sarılık ve kan işeme görülen sürülerden elde edilen toplam 1445 sığır serumunun 258 (%17.8)'inde antikor saptamışlar, bunların *L. hardjo*, *L. grippityphosa* ve *L. hebdomadis*'e karşı oluştuğunu bildirmişlerdir.

Özkan ve ark. (20), Erzurum ili ve çevresinde yetiştirilen sığırları leptospira infeksiyonu yönünden incelemişler, kan işeme ve sarılık saptanan 45 sığırdan aldıkları serumlardan sekiz (%18)'ini pozitif bulduklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar hastalığın tanısını histopatolojik ve hayvan deneyi (hamster) ile doğruladıklarını da bildirmişlerdir.

Çetinkaya ve ark. (5) Elazığ ilinde sığırlarda leptospirozisin prevalansının saptanması için, tesadüfi örnekleme ile toplam 395 sığırdan alınan kan serumu örneklerini *L. hardjo*, *L. grippityphosa*, *L. pomona*, ve *L. icterohaemorrhagiae* antikorları yönünden MAT ile incelemişler ve sekiz (%2.03) kan serumunu pozitif saptamışlar, pozitif saptanan serumların yedi (%1.77)'sinin *L. hardjo* ve bir (%0.25) adedinin *L. grippityphosa* antijeni ile aglutinasyon verdiğini bildirmişlerdir.

Türkiye'de olduğu gibi, diğer ülkelerde de sığır leptospirozisi üzerine yoğun araştırmalar yapılmıştır. Gregoire ve ark. (13) Kanada'da mezbahalardan aldıkları 122 sığıra ait nefritli böbrek örneğini ve aynı hayvanların kan serumlarını leptospirozis yönünden incelemişler, 39 (%29) örnekten leptospiraları izole ettiklerini ve MAT ile 29 (%24) serum örneğinde serovar *hardjo*'ya karşı, 13 (%10) serum örneğinde ise serovar *pomona*'ya karşı antikor saptadıklarını bildirmişlerdir.

Tremel ve Nesnalova (28) Çek Cumhuriyeti'nde mezbahalara sevk edilen 1239 sığır kan serumunun 91 (%7.4)'inde leptospiralara karşı antikor saptadıklarını ancak yapılan bakteriyoskopi ve kültür çalışmalarında etkenlere rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Miller ve ark. (17) ABD'nin 49 eyaleti ve Puerto Rico'da mezbahalardan toplanan 5141 böbrek ve 5111 kan serumu örneğini incelemişler, 88 (%1.7) böbrek örneğinden leptospiraları izole ettiklerini, 12 leptospira serovarına ait antijenler ile gerçekleştirdikleri MAT sonucunda ise 2493 (%49) kan serumunda pozitif reaksiyon saptadıklarını, baskın serovarlardan sırasıyla *hardjo*, *pomona* ve *grippotyphosa* olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar izolasyon oranının düşük olmasının nedeninin böbreklerde kültür ile saptanamayacak kadar az etken olması ya da artık idrarlarıyla leptospiraları saçmayan sığırlardaki rezidüyel antikorların saptanması olabileceğini vurgulamışlardır.

Thierman (27) ABD'de 204 sığır a ait kan serumu örneklerini leptospirozis yönünden serolojik olarak incelemiş ve aynı sığırlara ait böbrek örneklerinden izolasyon çalışması yapmıştır. Araştırmacı MAT ile 29 (%14.5), ELISA ile 79 (%39.5) serum örneğinde leptospiralara karşı antikor saptadığını, 13 (%6.4) böbrek örneğinden leptospiraları izole ettiğini açıklamıştır. Araştırmacı ayrıca serovar *hardjo* ile deneysel infekte edilen hayvanlarda serolojik olarak yüksek antikor titreleri saptamalarına karşın hem bakteriyoskopi hem de kültür ile etkenleri saptamada başarısız olduklarını, bunun nedenlerinden birisinin de serovar *hardjo*'nun izolasyonunun güç olmasından kaynaklanabileceğini bildirmiştir.

Bu araştırmada mezbahalara kesime sevk edilen sığırlara ait böbrek örneklerinden yapılan bakteriyoskopi sonucunda leptospiralar görülmemiş ve aynı örneklerden sıvı EMJH besiyerlerine yapılan ekimler sonucunda da etken izole edilmemiştir. Ülkemizde kesime sevk edilen sığırlarda leptospirozisin bakteriyolojik tanısı ile ilgili çalışma yapıldığına dair bir literatüre rastlanmamıştır. Ancak diğer ülkelerdeki araştırmacıların bu konuda yaptıkları çalışmalar incelendiğinde, mezbaha örneklerinde leptospira izolasyon oranlarının oldukça düşük olduğu gözlenmiştir (17, 27, 28). Bu araştırmada leptospira izole edilmemesinin nedeninin, mezbahalarda kesilen sığırların çoğunluğunun 1.5-2 yaş grubunda genç hayvanlar olması ve yetiştirilmeleri sırasında çevre ve daha yaşlı hayvanlarla ilişkilerinin az olmasından kaynaklandığı kanısına varılmıştır. Kesime sevk edilen sığırların kan serumu örneklerinden yapılan serolojik çalışmaların sonucunda da MAT ile yalnızca bir, ELISA ile ise iki adet serumda pozitif reaksiyon saptanması bakteriyoskopi ve izolasyon bulgularını desteklemektedir.

Bu araştırmada, genel olarak MAT ile saptanan %3.65'lik pozitiflik oranı Özdemir'in aynı yöredeki bulgularıyla (%3.39) uyum göstermektedir, ancak araştırmacının saptadığı Türkiye ortalamasından (%8) düşüktür. Bu durumun bölgesel değişikliklerden (ısı, yağış miktarı, toprağın yapısı) ve yetiştirme farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünüldü. Türkiye'de yapılan benzer çalışmaların çoğunluğunda, serum örneklerinin klinik olarak

leptospirozis şüpheli hayvanlardan alınması nedeniyle hastalığın prevalansının yüksek olduğu gözlenmektedir (3, 20).

Leptospirozis tanısı için ELISA ve MAT'ın birlikte kullanıldığı araştırmalarda ELISA ile saptanan sero-pozitiflik oranlarının MAT ile saptanandan yüksek olduğu dikkati çekmektedir (10, 25, 27). Bu araştırmada MAT ile yedi (%3.65) serum örneğinde, ELISA ile 12 (%6.25) serum örneğinde incelenen leptospira serovarlarına karşı spesifik antikorlar saptandı. MAT ile pozitif olarak saptanan yedi serum örneğinin altı'sı ELISA ile de pozitif olarak belirlendi. Aradaki bu küçük farkın MAT ile hem IgG hem de IgM tip antikorların saptanabilmesine karşın, ELISA ile yalnızca IgG izotipleri belirlenmiş olmasından kaynaklandığı düşünüldü. Bununla birlikte, MAT ile antikor bulunamayan altı serum örneğinde ELISA ile spesifik antikorlar tanımlanmıştır.

Bu araştırmada ELISA'nın sığır leptospirozisinin tanısı için özgün ve duyarlı bir test olduğu saptandı. MAT standart test olarak alındığında ELISA'nın özgünlüğü %96.8 ve duyarlılığı %85.7 olarak belirlendi. Ölü antijen kullanılması, ayıraçlarının stabilitesi ve uygulama kolaylığı gibi avantajları nedeniyle MAT yerine kullanılacak bir test olabileceği belirlendi.

Farklı ülkelerde yapılan araştırmalar sonucunda, sığır leptospirozisinin prevalansı ve neden olan serovarlar değişiklikler göstermekle birlikte sığır leptospirozisinin en yaygın etkeninin serovar *hardjo* olduğu bildirilmiştir (2, 17, 29, 30). Bu araştırmada, Trakya yöresindeki sığırlarda leptospirozis etkeni olarak serovar *hardjo*'nun baskın olduğu ve serovar *grippotyphosa*'nın da infeksiyonlara yol açabileceği saptandı. MAT ve ELISA ile antikor saptanan sığırların tamamının iki ya da daha yaşlı oldukları dikkati çekti. Ayrıca dişi hayvanlarda infeksiyonun prevalansı erkeklerle oranla her iki test ile de daha yüksek saptandı. ELISA bulgularına göre aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Trakya yöresinde suni tohumlama çalışmaları yoğun olarak yapılmakta ve erkek sığırlar genellikle et besiciliği için yetiştirilmektedir. Bu nedenle erkek hayvanlar genellikle meraya fazla salınmamakta, çevreyle ilişkileri daha az olmakta ve daha genç yaşlarda kesilmektedir. Bu durum infeksiyonun prevalansının dişi hayvanlarda daha yüksek bulunmasının nedenini açıklamaktadır.

Bulgular iller bazında incelendiğinde, en yüksek seroprevalans oranı Edirne'de belirlendi, buna karşın İstanbul ilinden alınan kan serumlarında antikor saptanmadı. Edirne ile Tekirdağ ve İstanbul illeri arasında her iki test ile saptanan pozitiflik oranlarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Leptospiraların çeltik tarlaları gibi yüzey sularında kolay üreyebilme özelliğine sahip olması ve yoğun çeltik tarımının yapıldığı Edirne ilinde hayvanların bu alanlarda otlatılması, ilde saptanan yüksek pozitiflik oranını açıklamaktadır.

Teşekkür

Değerli yardımlarından dolayı Etlik Merkez Vet. Kont. Araş. Enst. Leptospira Laboratuvarı Şefi Dr. Vildan ÖZDEMİR' e teşekkürlerimizi sunarız.

Tablo 1. MAT pozitif bulunan sığırların ırk, cinsiyet, yaş ve MAT titrelere ile kaynakları.
Table 1. Breed, sex, age, source of positive cattle by MAT, and MAT titers to the serovars.

SERUM NO	CİNSİYET	YAŞ	IRK	H	G	İ	P	KAYNAK
72 (MEZBAHA)	E	2	ESMER	-	1/400	-	-	KIRKLARELİ MERKEZ
84 (ÇİFTLİK)	D	7	S. ALACA	1/100	-	-	-	KIRKLARELİ VİZE
89 (ÇİFTLİK)	D	8	BOZ	1/100	-	-	-	EDİRNE İPSALA
90 (ÇİFTLİK)	D	5.5	BOZ	1/100	-	-	-	EDİRNE İPSALA
91 (ÇİFTLİK)	D	3	BOZ	1/100	-	-	-	EDİRNE İPSALA
92 (ÇİFTLİK)	D	4	BOZ	1/100	-	-	-	EDİRNE İPSALA
95 (ÇİFTLİK)	D	4	BOZ	1/100	-	-	-	EDİRNE İPSALA

H: HARDJO; G: GRIPPOTYPHOSA; İ: İCTEROHAEMORRHAGIAE; P: POMONA ; -: NEGATİF

Tablo 2. ELISA ile pozitif saptanan sığırların ırk, cinsiyet, yaş ve kaynakları.**Table 2.** Breed, sex, age and source of seropositive cattle by ELISA.

SERUM NO	CİNSİYET	YAŞ	IRK	H	G	İ	P	KAYNAK
66 (M)	D	6	SA		+			KIRKLARELİ MERKEZ
72 (M)	E	2	E		+			KIRKLARELİ MERKEZ
62 (Ç)	D	2	SA	+				TEKİRDAĞ MALKARA
65 (Ç)	D	2	SA	+				EDİRNE MERKEZ
84 (Ç)	D	7	SA	+				KIRKLARELİ VİZE
88 (Ç)	D	4	BOZ	+				EDİRNE İPSALA
89 (Ç)	D	8	BOZ	+				EDİRNE İPSALA
90 (Ç)	D	5.5	BOZ	+				EDİRNE İPSALA
92 (Ç)	D	4	BOZ	+				EDİRNE İPSALA
93 (Ç)	D	4	BOZ	+				EDİRNE İPSALA
95 (Ç)	D	4	BOZ	+				EDİRNE İPSALA
96 (Ç)	D	9	BOZ	+				EDİRNE İPSALA

M: MEZBAHA; Ç: ÇİFTLİK; SA: SIYAH ALACA; E: ESMER; H: HARDJO;
G: GRIPPOTYPHOZA; İ: İCTEROHAEMORRHAGİAE; P: POMONA; +: POZİTİF

Kaynaklar

- Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M., Diker, S.: Özel Mikrobiyoloji. 4. Baskı. Ankara, Medisan Yayınevi, 1997.
- Bolin, C.A., Alt, D.P., Zuerner, R.L.: Protection of cattle from infection with *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo*. International Leptospirosis Society. Second Meeting on Leptospirosis, Marysville, Australia, 1999.
- Bulu, A., Dörteller, R., Özkan, Ö., Hoştürk, F.: Doğu Anadolu'nun bazı illerinde sığır ve koyunlarda leptospirosis vak'aları, yayılışı ve sero tipleri üzerine araştırma. Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg., 1990; 6 (6): 49-60.
- Cole, J.R., Catherine, R.S., Pursell, A.R.: Improved microtechnique for the leptospiral Microscopic Agglutination Test. Appl. Microbiol., 1973; 25 (6): 976-980.
- Çetinkaya, B., Ertaş, H.B., Muz, A., Öngör, H., Kalender, H., Özdemir, V.: Elazığ ilinde sığırlarda leptospirosis'in seroprevalanslarının saptanması. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 1999; 23 (2): 1-7.

6. Diker, K.S.: Epidemiyoloji. A.Ü. Veteriner Fakültesi Öğrenci Ders Notu. Ankara, 1994.
7. Ellis, W.A.: The diagnosis of abortion due to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. 2nd International Symposium of Laboratory Diagnosticians. Lucerne, Switzerland, 1981; 149-151.
8. Ellis, W.A., O'Brien, J.J., Cassells, J.: Role of in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype *hardjo* infection in Northern Ireland. Vet. Rec., 1981; 108: 555-557.
9. Ellis, W.A., O'Brien, J.J., Neill, S.D., Ferguson, H.W., Hanna, J.: Bovine Leptospirosis: Microbiological and serological findings in aborted fetuses. Vet. Rec., 1982; 110: 147-150.
10. Ertaş, H.B., Çetinkaya, B., Muz, A., Öngör, H., Özdemir, V., Yazıcıoğlu, N.: Sığırlarda Leptospirosis'in tanısında MAT ve ELISA'nın kullanımı. IV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 2000: 46.
11. Evrim, M., Güneş, H.: Biyometri Ders Notları. İ.Ü. Vet. Fak. Yayın No: 81. İstanbul, 1998: 27-43.
12. Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P.: *Leptospira* and Leptospirosis. 2. Ed. Melbourne, Australia, Medisci., 1999.
13. Gregoire N., Higgins R., Robinson Y.: Isolation of leptospires from nephritic kidneys of beef cattle at slaughter. Am. J. Vet. Res., 1987; 48 (3): 370-371.
14. Hathaway S.C., Little T.W.A.: Epidemiological study of *Leptospira hardjo* infection in second calf dairy cows. Vet. Rec., 1983; 112: 218-218.
15. Hodges, R.T., Ekdahl, M.O.: Use of Flourescent Antibody Technique for the serological differentiation of leptospiral serotypes in cultures and bovine urine. N. Z. Vet. J., 1973; 21: 109-115.
16. Leonard, F.C., Quins, P.J., Ellis, W.A.: Association between cessation of leptospiruria in cattle and urinary antibody levels. Res. Vet. Sci. 1993; 55: 195-202.
17. Miller, D.A., Wilson, M.A., Beran, G.W.: Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. Am. J. Vet. Res., 1991; 52 (11): 1761-1765.
18. Milner, A.R., Wilks, C.R., Calvert, K.: The prevalence of antibodies to members of *Leptospira interrogans* in cattle. Aust. Vet. J., 1980; 56: 327-330.
19. Özdemir, V.: Türkiye'de leptospirozisin dağılımı ve serotiplendirilmesi üzerine bir çalışma. I. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 1994.
20. Özkan, Ö., Dörteller, R., Hoştürk, F.: Erzurum ili ve yöresindeki sığır ve koyunlarda sarılık ve kan işeme semptomlarıyla seyreden hastalıklarda *Clostridium oedematiens*, leptospira ve kan protozoonlarının insidansının belirlenmesi. Etlik Vet. Mikrobiyol. Der., 1993; 7 (4): 97-104.
21. Roth, E.E., Galton, M.M.: Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in Louisiana. Am. J. Vet. Res., 1960; 5: 422-427.
22. Schönberg, A., Plageman, R., Korver, H.: Isolation of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* from cattle on A dairy farm in Germany. VIII th Meeting of European Leptospira Workers. Rome, 1994.

23. Staak, C., Mekaprateep, M., Kampe, U., Schönberg, A.: Serological reactions of leptospirosis – positive (MAT and CFT) bovine sera in ELISA. *J. Vet. Med.*, 1990; 37: 582-586.
24. Surujballi, O., Henning, D., Marenger, R., Howlett, C.: Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* type *hardjo-ovis* antibodies in bovine sera. *Can. J. Vet. Res.*, 1997; 61: 267-274.
25. Sahin, M., Aydın, F., Özdemir, V., Genç, O., Güler, M.A.: Kars ve Ardahan illerinde sığır leptospirozisinin kültürel ve serolojik yöntemlerle araştırılması. IV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 2000: 48.
26. Terpstra, W.J., Njenga, R., Korver, H., Ligthart, G.S.: ELISA for the detection of leptospirosis in Kenya. *E. Afr. Med. J.*, 1987; 64: 49-54.
27. Thierman, A.B.: Bovine leptospirosis: Bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. *Am. J. Vet. Res.*, 1983; 44 (12): 2244-2245.
28. Tremi, A., Nesnalova, E.: Leptospirosis in slaughter cattle – serological and bacteriological examinations. *Vet. Med. – Czech.*, 1995; 40 (10): 305-309.
29. Vasconcellos, S.A., Barbarani, J.O., Umehara, O., Morais, Z.M., Cortez, A., Pinheiro, S.R., Ferreira, F., Favero, A., Neto, J.S.: Bovine leptospirosis: Occurrence and most prevalent serovars in farms from states of south, southeastern and center regions of Brazil. International Leptospirosis Society Second Meeting on Leptospirosis. Marysville, Australia, 1999.
30. White, F.H., Sulzer, K.R., Engel, R.W.: Isolation of *Leptospira interrogans* serovars *hardjo*, *balcanica*, and *pomona* from cattle at slaughter. *Am. J. Vet. Res.*, 1982; 43. (7): 1172-1173.